



PCT/PL2005/00022

Z A Ś W I A D C Z E N I E

Fundacja Rozwoju Diagnostyki i Terapii

Warszawa, Polska

złożyła w Urzędzie Patentowym Rzeczypospolitej Polskiej dnia 29 marca 2004 r. podanie o udzielenie patentu na wynalazek pt. „**Nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu oraz sposób ich otrzymywania.**”

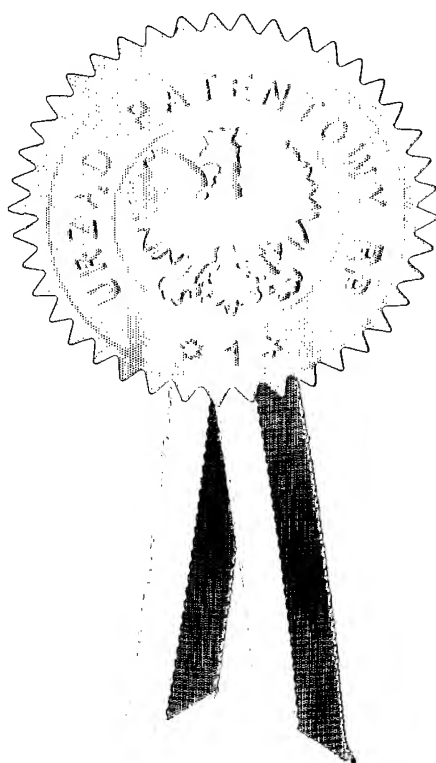
Dołączone do niniejszego zaświadczenia opis wynalazku, zastrzeżenia patentowe są wierną kopią dokumentów złożonych przy podaniu w dniu 29 marca 2004 r.

Podanie złożono za numerem **P-366690**.

Warszawa, dnia 17 czerwca 2005 r.

z upoważnienia Prezesa

mgr inż. Monika Więckowska
Dyrektor Departamentu



Nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu oraz sposób ich otrzymywania

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu oraz sposób ich otrzymywania.

Ze stanu techniki znany jest niepodstawiony 2-amino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol znaleziony w owocach jako produkt degradacji środka przeciwwrobaczego Benomylu (Pease i Gardiner, 1969). Jego strukturę zaproponowana na podstawie widma masowego, jednak jego synteza nie została dotychczas opisana.

Z opisu patentowego nr US 2003/0027842A1 znany jest 2-hydroksy 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol otrzymany w reakcji bromowania 3-karboksy-4,6,7-tribromo-2-hydroksybenzimidazolu oraz 1-alkilo-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole otrzymywane poprzez alkilowanie halogenkiem 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu w środowisku zasadowym.

Halogenopochodne benzimidazolu wykazują wiele interesujących właściwości biologicznych. Wiadomo jest, że pochodne 2-trifluorobenzimidazolu jak i niektóre pochodne bromobenzimidazoli posiadają wysoką aktywność przeciwpierwotniakową, przeciwbakteryjną i przeciwwirusową (Navarete-Vazquez et al. Bioorg.Med.Chem.Lett.11, (2001), 187-191¹; Andrzejewska et al.Eur.J.Med.Chem. 37 (2002), 972-978)². Najbardziej prawdopodobne wyjaśnienie szczególnej aktywności biologicznej halogenopochodnych benzimidazolu to posiadanie przez nie zdolności zakłócenia metabolizmu komórki poprzez inhibicję enzymów regulujących metabolizm kinaz białkowych.

Kinazy białkowe są dużą grupą enzymów (ponad 500 rodzajów kodowanych przez ludzki genom) obecnych w każdej komórce eukariotycznej i proeukariotycznej spełniających szczególną rolę regulatorów mechanizmów komórkowych. Enzymy te katalizują przeniesienie grupy fosforanowej z ATP ewentualnie GTP na aminokwasy serynę, treoninę lub tyrozynę. Są to

generalnie „spokojne” enzymy, uaktywniają się jednak na poszczególnych etapach, w tym także patologicznych, metabolizmu komórki. Obecnie kinazy białkowe, a szczególnie ich inhibitory, cieszą się dużym zainteresowaniem jako potencjalne obiekty pomocne w projektowaniu specyficznych leków. Owocem badań nad inhibitorami kinaz jest przykładowo Gleevec, lek przeciwko chronicznej białaczce szpikowej (Druker i inni. 2001)³.

Szczególną rodziną kinaz białkowych są tzw. kinazy kazeinowe (CK1 i CK2), dla których istnieje ponad trzysta białek będących substratami dla tych enzymów. Uczestniczą one w wielu procesach komórkowych (Litchfield, 2003)⁴. Zebrano wiele dowodów, że ich podjednostki mogą zachowywać się jako onkogeny (Kelliher i inni, 1996, Orlandini i inni, 1998)^{5,6,7}. Najbardziej znanym i silnym inhibitorem kinazy kazeinowej 2 (CK2) jest 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol (TBB)(Sarno i inni, 2001).

Badania farmakologiczne:

Badano efekt cytotoksyczny 4,5,6,7-tetrabromo-2-dimetyloaminobenzimidazolu na komórki białaczki ludzkiej typu Jurkat T.

1. Komórki białaczki typu Jurkat inkubowano 24 godziny w medium o wzrastającym stężeniu 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (TBB) lub 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (K25). Efekt cytotoksyczny oznaczano używając metody barwienia MTT (bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-yl)-3,5-difenylotriazolowy). Jako kontrolę prowadzono inkubację komórek w medium z dodatkiem rozpuszczalnika (DMSO, 05% v/v). Wartości przedstawiono jako średnią z trzech eksperymentów. Otrzymany efekt cytotoksyczny 4,5,6,7-tetrabromo-2-dimetyloaminobenzimidazolu na komórki białaczki ludzkiej typu Jurkat T przedstawiono na Fig.1. Otrzymane wyniki potwierdzają, że 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol jest kilkukrotnie bardziej aktywny niż tetrabromobenzotriazol - znany inhibitor kinazy kazeinowej 2.
2. Komórki białaczki typu Jurkat inkubowano 14 godzin bez dodatku 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (C), oraz w medium o stężeniu 5 lub 10 uM 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu oraz 50 ng/ml antiFas (aF), substancji kontrolnej do śledzenia procesu apoptozy. Aktywację kaspazy-białka enzymatycznego kontrolującego apoptozę stwierdzono obserwując degradację dwóch białek będących substratami tego enzymu HS1 i PARP. Efekt przedstawiono na Fig 2. Otrzymane wyniki wskazują, że molekularny mechanizm działania 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu może być wyjaśniony poprzez indukcję apoptozy-programowanej śmierci komórek.

Testy aktywności enzymatycznej kinaz przeprowadzono według metodyki opisanej przez Sarno i inni 2003. i zapisano w tabeli 1. Szczątkowa aktywność była określona poprzez inkubację w obecności inhibitora o stężeniu $10\mu\text{M}$ i wyrażona jako procent aktywności bez inhibitora.

Tabela 1. Testy aktywności enzymatycznej kinaz.

lp	Kinaza*	4,5,6,7-tetrabromo-benzotriazol (TBB)	2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol (K25)
1.	CK1	91	87
2.	CK2	13	4
3.	G-CK	95	92
4.	DYRK1a	22	2

*CK1 – kinaza kazeinowa 1, CK2 – kinaza kazeinowa 2, G-CK- kinaza kazeinowa z aparatu Golgiego, DYRK1a – (Dual-specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase) Kinaza tyrozynowa o właściwościach regulacyjnych.

Dane eksperymentalne:

Natywna CK1 (nCK1) i CK2 (nCK2) została oczyszczona z wątroby szczura (Meggio i wsp., 1981); CK aparatu Golgiego (G-CK), oczyszczona z wydzielającego mleko gruczołu sutkowego szczura, była dostarczona przez Dr A.N. Brunati (Padwa, Włochy). Białko kinaz tyrozynowych Lyn, c-Fgr, Syk (również określana TPK-IIb) były oczyszczone ze śledziony szczura, jak poprzednio w odnośniku literaturowym (Sarno i wsp., 2003). Rekombinowane podjednostki α i β ludzkiej CK2 były produkowane w *E. coli* a holoenzym był rekonstruowany i oczyszczony jak opisano poprzednio (Sarno i wsp. 1996). Mutanty CK2: V66A i I174A uzyskano jak to opisano uprzednio (Sarno i wsp. 2003). Podwójny mutant V66AI174A otrzymano przy użyciu zestawu: "QuickChange-SiteDirected Mutagenesis" (Stratagene), stosując ludzki V66A α cDNA włączony w wektor pT7-7 jako matryca i dwa syntetyczne oligonukleotydowe primery, 5'-GCACAGAAAGCTACGACTAGCAGACTGGGGTTTGGC-3' i 5'-GCCAAACCCCAGTCTGCTAGTCGTA-CTTTCTGTGC-3', każdy komplementarny do przeciwległych łańcuchów matrycy. Ekspresja i oczyszczanie mutantu przeprowadzono jak opisano poprzednio (Sarno i wsp., 2003). *Saccharomyces cerevisiae* pID261 był dostarczony przez Dr S. Facchin (Padwa, Włochy). Źródło wszystkich innych kinaz białkowych użytych w oznaczeniach specyficzności jest albo opisane albo posiada odnośnik literaturowy podany przez Daviesa i wsp. (2000).

Oznaczenia kinetyki:

Szybkości początkowe były oznaczane przy każdym z badanych stężeń substratu. Wartości K_m były obliczane albo w nieobecności albo w obecności zwiększających się stężeń inhibitora z

wykresów podwójnej odwrotności Lineweavera-Burke'a. Stałe inhibitorowe były obliczane poprzez analizę regresji liniowej wykresów K_m/V_{max} *versus* stężenie inhibitora. Biorąc pod uwagę, że wszystkie pochodne TBI zachowują się jak inhibitory kompetycyjne względem ATP, stałe inhibicji były również wyprowadzane z zależności IC_{50}/K_i Chenga-Prusoffa (Cheng i Prusoff, 1973) przez oznaczenie IC_{50} dla każdego związku przy $1 \mu M$ stężeniu ATP.

Testy fosforylacji kinazy kazeinowej 2 (CK2):

Testy fosforylacji prowadzone były w obecności wzrastającego stężenia każdego inhibitora w próbce o objętości końcowej $25 \mu l$ zawierającej $50 mM$ buforu Tris-HCl o pH 7.5, $100 mM$ NaCl, $12 mM$ $MgCl_2$, $100 \mu M$ syntetycznego peptydu RRRADDSDDDDD będącego substratem fosforylacji i $0.02 \mu M$ γ - ^{33}P -ATP. Inkubację prowadzono przez 10 min w temperaturze $37^\circ C$. Reakcję zatrzymywano przez dodanie $5 \mu l$ $0.5 M$ kwasu ortofosforowego. Mieszaninę inkubacyjną przenoszono na filtr z fosfocelulozy, który przemywano cztery razy $75 mM$ kwasem ortofosforowym (5 - $10 ml$), następnie metanolem i suszono przed zliczeniem impulsów w liczniku scyntylacyjnym.

Test przeżywalności:

Komórki ludzkiej białaczki typu Jurkat T były hodowane w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem 10% (v/v) albuminy cielęcej, $2 mM$ L-glutaminy, 100 jednostek/ml penicyliny i $100 \mu g/ml$ streptomycyny. Do testu komórki ($10^6/ml$) były zawieszone w medium zawierającym 1% (v/v) albuminy cielęcej, następnie inkubowane w $37^\circ C$ w obecności różnych stężeń inhibitora. Komórki w teście kontrolnym były traktowane taką ilością rozpuszczalnika, w jakiej rozpuszczono inhibitor. Inkubację przerywano przez dodanie buforu hipoosmotycznego jak to opisał Sarno i inni (2003). Przeżywalność komórek określono używając barwnika MTT (bromku 3-4,5-dimetylotiazol-2-yl)-3,5-difenylotriazolowego). Aktywację kaspazy obrazowano techniką Western-blot monitorując degradację białek PARP i HS1 jak to opisał Ruzzene i inni (2002).

Dane eksperymentalne otrzymane jako wynik tej pracy nieoczekiwanie wskazują, że będące przedmiotem wynalazku otrzymane nowe związki, zachowując czterobromowany fragment benzenowy, który dobrze dopasowuje się do zagłębienia hydrofobowego w pobliżu miejsca wiążącego ATP modyfikując triazolowy fragment cząsteczki, posiadają znacznie lepsze właściwości w stosunku do znanego 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazolu (TBB) jednego z najbardziej efektywnych i selektywnych inhibitorów kinazy kazeinowej 2.

Stwierdzono, że zastąpienie atomu azotu w pozycji 2 przez atom węgla pozwala na łatwiejsze dalsze modyfikacje w tej pozycji poprzez zastąpienie atomu wodoru w pozycji 2 grupami hydrofilowymi, co z

kolei umożliwia powstawanie nowych oddziaływań typu van der Waalsa, lub tworzenie wiązań wodorowych z polarnymi łańcuchami kinazy.

Najbardziej efektywny spośród zsyntetyzowanych inhibitorów, pochodnych benzimidazolu okazał się 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol (K25), dla którego stała inhibicji (40nM) jest najniższą z dotychczas zaobserwowanych dla inhibitorów CK2. Jest ona o jeden rząd wielkości mniejszą niż dla TBB. Na podkreślenie zasługuje selektywność K25, porównywalna z TBB, gdyż tylko jedna kinaza, mianowicie DYRK1a spośród badanych ponad 30 kinaz wykazuje podobną podatność na inhibicję przez K25. Jednakże bardziej istotna jest kilkukrotnie wyższa cytotoksyczność K25 w porównaniu z TBB w stosunku do komórek białaczki typu Jurkat. K25 w odróżnieniu do TBB nie powoduje depolaryzacji izolowanych mitochondriów. Wszystko to wskazuje bezwzględnie, że K25 ma większe zalety niż TBB zwłaszcza do badań *in vivo*.

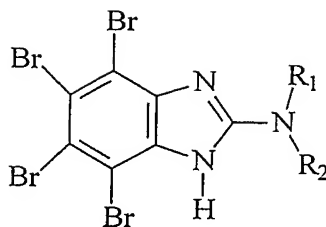
Stwierdziliśmy eksperymentalnie, że niektóre podstawione na grupie aminowej 2-amino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole, są silniejszymi inhibitorami CK2 niż TBB, wyniki zestawiono w Tabeli 2. Tym samym wspomniane podstawione na grupie aminowej 2-amino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazole mogą być użyteczne jako potencjalne leki jak również odczynniki do badań w biologii molekularnej.

Tabela 2. Efektywność pochodnych 2-amino-4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu jako inhibitorów CK2.

L.p.	Związek	Stała inhibicji K_i (μ M)
1.	4,5,6,7-tetrabromobenzotriazol (TBB)	0.30
2.	2-amino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.09
3.	2-metyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.09
4.	2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol (K25)	0.04
5.	2-etanoloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.13
6.	2-izopropylamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.06
7.	2-(2-hydroksy)propyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.14
8.	2-dimetyloaminoetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazol	0.16

W związku ze znanym stanem wiedzy wskazującym na dużą ekspresję kinazy kazeinowej w mózgu chorych obciążonych syndromem Downa jak również w przypadku choroby Alzheimera, w których to chorobach występuje nadprodukcja kinazy DYRK1a, wydaje się bardzo prawdopodobną możliwość zastosowania nowych związków wg wynalazku do leczenia wymienionych chorób.

Podstawowym aspektem wynalazku są nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu o wzorze 1



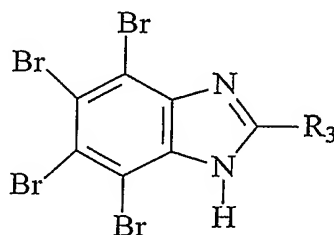
wzór 1

w którym R_1 oznacza atom wodoru lub rodnik alifatyczny a R_2 oznacza rodnik alifatyczny ewentualnie dodatkowo podstawiony atomem wodoru lub podstawnikiem, takim jak grupa hydroksylowa, lub podstawiona grupa aminowa.

Nowymi pochodnymi są w przypadku niniejszego wynalazku następujące związki:

- 2-metyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-etanoloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-izopropylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-(2-hydroksypropylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol,
- 2-(2-dimetyloaminoetylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol.

Dodatkowym aspektem wynalazku jest sposób otrzymywania nowych pochodnych 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu o wzorze 1, w którym R_1 oznacza atom wodoru lub rodnik alifatyczny a R_2 oznacza rodnik alifatyczny ewentualnie dodatkowo podstawiony atomem wodoru lub podstawnikiem, takim jak grupa hydroksylowa, lub podstawiona grupa aminowa, w reakcji związku o wzorze 2,



wzór 2

w którym podstawnik R_3 oznacza atom fluorowca, grupę alkilotiolową lub alkoksylową lub inną grupę łatwo ulegającą podstawieniu, z aminą, w podwyższonej temperaturze, a następnie otrzymany produkt poddaje się oczyszczaniu przez krystalizację lub chromatografię na żelu krzemionkowym po czym ewentualnie działaniem kwasu nieorganicznego lub organicznego przeprowadza się w sól. Sposobem według wynalazku w związku o wzorze 2 podstawnik R_3 oznacza atom fluorowca taki jak Cl lub Br lub grupę alkilotiolową taką jak CH_3S , $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{S}$,

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$, lub niższy alkoksyl taki jak grupa CH_3O , $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ lub inną grupę łatwo ulegającą podstawieniu taką jak grupa sulfonowa lub grupa alkilosulfotlenkowa.

Jako amina stosowana jest niższa alifatyczna amina pierwszorzędowa ewentualnie zawierająca w łańcuchu alifatycznym dodatkowo grupy hydroksylowe lub podstawione grupy aminowe. Jako amina może być także używana niższa alifatyczna amina drugorzędowa. Znamienne i korzystne dla sposobu według wynalazku jest, że amina stosowana jest jako reagent i rozpuszczalnik, w roztworze wodnym lub alkoholowym a reakcję związku o wzorze 2 z aminą prowadzi się w zakresie temperatur od 80 do 140 °C.

Otrzymane związki o wzorze 1 mogą zostać przekształcone w znany sposób w sole kwasów nieorganicznych lub organicznych.

Kolejnym aspektem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna o działaniu przeciwnowotworowym, zawierająca efektywnie przeciwnowotworowo działającą ilość nowego związku wg wynalazku w kombinacji z co najmniej jednym obojętnym, farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem, rozcieńczalnikiem lub zaróbką.

Związki według niniejszego wynalazku mogą być wytwarzane i podawane w bardzo różnych postaciach dawek do podawania doustnego i pozajelitowego. I tak związki według wynalazku, mogą być podawane na drodze iniekcji to jest dożylnie, domięśniowo, śródskórnio, podskórnio, wewnątrzdwunastniczo, wewnątrztrzewnowo. W przeznaczeniu do podawania drogą pozajelitową wytwarza się postacie dawek jednostkowych w formie płynnej z udziałem każdego ze związków według wynalazku, a przykładowo 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolu i jałowego wehikulum, przy czym korzystnie stosuje się wodę. Wymienione związki, w zależności od rodzaju farmaceutycznie zgodnego nośnika mogą być zawieszone, albo rozpuszczone w wehikulum. Przy sporządzaniu roztworu, związek aktywny można rozpuścić w wodzie do wstrzykiwań i wyjałowić przez sączenie. Tak otrzymanym jałowym roztworem napelnia się fiołki lub ampułki, które następnie szczelnie się zamyka. Preparat po wypełnieniu nim fiołki można również zamrozić i usunąć wodę w warunkach próżni. Następnie suchy liofilizowany proszek zamyka się szczelnie we fiołce, do której dołącza się drugą fiołkę zawierającą wodę do wstrzykiwań, w celu przygotowania roztworu do wstrzykiwań. Związki te mogą być również podawane inhalacyjnie lub przezskórnio. Jest oczywistym dla specjalistów, że przedstawione formy dawkowania mogą zawierać jako składnik aktywny, zarówno nowe związki jak i farmaceutycznie dopuszczalną sól każdego ze związków wg wynalazku. Farmaceutycznie dopuszczalne nośniki, stosowane do wytwarzania kompozycji farmaceutycznych mogą być cieczą lub ciałem stałym. Preparaty w postaci ciała stałego obejmują proszki, tabletki, pigułki, kapsułki oraz dyspergowane granulki. Nośnikiem w postaci ciała stałego może być jedna lub

kilka substancji, które mogą działać jako rozcieńczalniki, rozpuszczalniki, środki wiążące, konserwujące, dezintegrujące lub materiał kapsułkujący.

Kolejnym aspektem wynalazku jest zastosowanie nowych pochodnych wg wynalazku do wytwarzania leku o działaniu przeciwnowotworowym.

Aspektem wynalazku jest także sposób hamowania aktywności kinezy kazeinowej 2 u pacjentów wymagających takiego leczenia przez podawanie skutecznej ilości nowych pochodnych wg wynalazku

Obecny wynalazek będzie łatwiejszy do zrozumienia na podstawie konkretnych przykładów, które uzupełnione zostały załączonymi rysunkami (Fig) i które mają na celu zilustrowanie wynalazku a nie ograniczenie jego zakresu.

Opis rysunków (Fig):

Fig.1. ilustruje efekt cytotoksyczny 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu na komórki białaczki ludzkiej typu Jurkat T.

Fig.2. ilustruje mechanizm działania apoptotycznego 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu na komórki białaczki ludzkiej typu Jurkat poprzez aktywację kaspazy.

Synteza i charakterystyka pochodnych czterobromobenzoimidazolu (TBI):

Wszystkie odczynniki i rozpuszczalniki użyte do syntezy nabyto w Sigma-Aldrich. Temperatury topnienia (nie korygowane) były mierzone w otwartych rurkach kapilarnych w aparacie do pomiaru temperatury topnienia Gallenkamp-5. Widma absorpcji w ultrafiolecie rejestrowano w spektrometrze Kontron Uvikon 940. Widma ^1H NMR (w ppm) były mierzone przy użyciu spektrofotometrów Varian Gemini 200 MHz i Varian UNITY plus w 298°K w D₆ (DMSO). Jako standard wewnętrzny stosowano czterometylosilan. Chromatografię kolumnową przeprowadzono na żelu krzemionkowym (Merck) (rozmiary ziarna 230-400). Analityczna chromatografia cienkowarstwowa (TLC) była przeprowadzona na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym F₂₅₄ (Merck) (grubość 0,25 mm).

Przykład I. 2-Metyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol.

Mieszaninę 2-chloro-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (0.94 g, 2 mmole) i metyloaminy (30% roztwór w etanolu, 35 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszaninę odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 630 mg (68%) bezbarwnych kryształów o t.t. 283-285 °C. TLC (CHCl₃/MeOH, 9:1): R_f = 0.48. ^1H -NMR (D₆(DMSO)): 2.94 (d, CH₃), 6.69 (q, NH), 11.60 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C₈H₅Br₄N₃ (462.77): C, 20.76; H, 1.09; N, 9.08. Znaleziono: C, 20.70; H, 1.25; N, 8.83.

Przykład II. 2-Dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszaninę 2,4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu (1.02 g, 2 mmole) i dimetyloaminy (30% roztwór w etanolu, 30 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszaninę odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 710 mg (75%) bezbarwnych kryształów o t.t. >330 °C (z rozkładem). TLC (CHCl₃/MeOH, 9:1): R_f = 0.48. ¹H-NMR (D₆(DMSO)): 3.13 (s, 2 X CH₃), 11.50 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C₉H₇Br₄N₃ (476.79): C, 22.67; H, 1.48; N, 8.81. Znaleziono: C, 22.71; H, 1.61; N, 8.68.

Przykład III. 2-Etanołoamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszaninę 2-metylotio-4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu (0.96 g, 2 mmole) i etanołoaminy (10 ml) ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w łaźni olejowej o temperaturze 120 °C przez 8 godzin. Mieszaninę odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 610 mg (62%) bezbarwnych kryształów o t.t. 216-218 °C. TLC (CHCl₃/MeOH, 95:5): R_f = 0.48. ¹H-NMR (D₆(DMSO)): 1.05 (t, CH₂), 4.36 (t, CH₂), 4.90 (bs, OH), 6.68 (t, NH), 11.50 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C₉H₇Br₄N₃O (492.79): C, 21.94; H, 1.43; N, 8.53. Znaleziono: C, 21.90; H, 1.60; N, 8.40.

Przykład IV. 2-Izopropylamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszaninę 2,4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu (1.02 g, 2 mmole) i izopropylaminy (20% roztwór w etanolu, 25 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszaninę odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 690 mg (70%) bezbarwnych kryształów o t.t. 288-290 °C (z rozkładem). TLC (CHCl₃/MeOH, 9:1): R_f = 0.74. ¹H-NMR (D₆(DMSO)): 1.22 (d, 2 X CH₃), 4.05 (m, CH), 6.60 (d, NH), 11.20 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C₁₀H₉Br₄N₃ (490.82): C, 24.47; H, 1.85; N, 8.56. Znaleziono: C, 24.36; H, 1.98; N, 8.40.

Przykład V. 2-(2-Hydroksypropylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszaninę 2,4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu (1.02 g, 2 mmole) i 2-hydroksypropylaminy (10% roztwór wodny, 25 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszaninę odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 620 mg (61%) bezbarwnych kryształów o t.t. XXXX °C. TLC (CHCl₃/MeOH, 90:10): R_f = 0.45. ¹H-NMR (D₆(DMSO)): 1.12 (d, CH₃), 3.30 (m, CH₂), 3.83 (m, CH), 4.96 (d, OH), 6.62 (t, NH), 11.40 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C₁₀H₉Br₄N₃O (506.82): C, 23.70; H, 1.79; N, 8.29. Znaleziono: C, 23.66; H, 1.88; N, 8.16.

Przykład VI. 2-(2-Dimetyloaminoetylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol

Mieszaninę 2,4,5,6,7-pentabromobenzimidazolu (1.02 g, 2 mmole) i dimetyloaminoetyloaminy (10% roztwór etanolowy, 25 ml) ogrzewano 20 godzin w temperaturze 110-115 °C. Mieszaninę odparowano do sucha a pozostałość krystalizowano z 80% roztworu wodnego etanolu otrzymując 580 mg (56%) bezbarwnych kryształów o t.t. >250 °C (z rozkładem). TLC (CHCl₃/MeOH, 70:30): R_f = 0.15. ¹H-NMR (D₆(DMSO)): 2.29 (s, 2 X CH₃), 2.54 (m, CH₂), 3.43 (q, CH₂), 6.82 (t, NH), 11.10 (bs, NH-benz.). Analiza elementarna: wyliczono dla C₁₁H₁₂Br₄N₄ (519.86): C, 25.41; H, 2.33; N, 10.78. Znaleziono: C, 25.56; H, 2.48; N, 10.64.

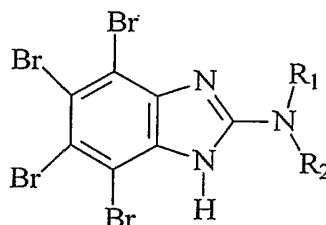
Przykład VII. Chlorowodorek 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolu.

2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazol (0,48 g, 1mmol) rozpuszczono na gorąco w etanolu (80 ml). Dodano kwas solny (36% roztwór wodny, 5 ml.). Prawie natychmiast z mieszaniny wypada drobnokrystaliczny osad. Mieszaninę oziębiono otrzymując 350 mg (68%) chlorowodoru w postaci drobnych igieł o. tt>330 °C (z rozkładem).

WZKŁAD
mgr Z. Kiewlicz
Tłumacz patentowy

Zastrzeżenia patentowe

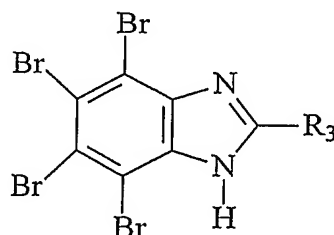
1. Nowe pochodne 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu o wzorze 1



wzór 1

w którym R₁ oznacza atom wodoru lub rodnik alifatyczny a R₂ oznacza rodnik alifatyczny ewentualnie dodatkowo podstawiony atomem wodoru lub podstawnikiem, takim jak grupa hydroksylowa, lub podstawiona grupa aminowa.

2. Nowa pochodna wg zastrz. 1, będąca 2-metyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
3. Nowa pochodna wg zastrz. 1, będąca 2-dimetyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
4. Nowa pochodna wg zastrz. 1, będąca 2-etanoloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
5. Nowa pochodna wg zastrz. 1, będąca 2-izopropyloamino-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
6. Nowa pochodna wg zastrz. 1, będąca 2-(2-hydroksypropyloamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
7. Nowa pochodna wg zastrz. 1, będąca 2-(2-dimetyloaminoetylamino)-4,5,6,7-tetrabromo-1H-benzimidazolem.
8. Sposób otrzymywania nowych pochodnych 4,5,6,7-tetrabromobenzimidazolu o wzorze 1, w którym R₁ oznacza atom wodoru lub rodnik alifatyczny a R₂ oznacza rodnik alifatyczny ewentualnie dodatkowo podstawiony atomem wodoru lub podstawnikiem, takim jak grupa hydroksylowa, lub podstawiona grupa aminowa, w reakcji związku o wzorze 2,



wzór 2

w którym podstawnik R_3 oznacza atom fluorowca, grupę alkilotiolową lub alkoksylową lub inną grupę łatwo ulegającą podstawieniu, z aminą, w podwyższonej temperaturze, a następnie otrzymany produkt poddaje się oczyszczaniu przez krystalizację lub chromatografię na żelu krzemionkowym, po czym ewentualnie działaniem kwasu nieorganicznego lub organicznego przeprowadza się w sól.

9. Sposób według zastrz. 8 znamienny tym, że w związku o wzorze 2 podstawnik R_3 oznacza atom fluorowca taki jak Cl lub Br lub grupę alkilotiolową taką jak CH_3S , C_2H_5S , C_3H_7S lub niższy alkoksyl, taki jak grupa CH_3O , C_2H_5O lub inną grupę łatwo ulegającą podstawieniu, taką jak grupa sulfonowa lub grupa alkilosulfotlenkowa.
10. Sposób według zastrz. 8 znamienny tym, że jako amina stosowana jest niższa alifatyczna amina pierwszorzędowa.
11. Sposób według zastrz. 10 znamienny tym, że amina alifatyczna pierwszorzędowa zawiera w łańcuchu alifatycznym dodatkowo grupy hydroksylowe lub podstawione grupy aminowe.
12. Sposób według zastrz. 8 znamienny tym, że jako amina używana jest niższa alifatyczna amina drugorzędowa.
13. Sposób według zastrz. 8 znamienny tym, że amina jest stosowana jest jako reagent i rozpuszczalnik, w roztworze wodnym lub alkoholowym.
14. Sposób według zastrz. 8 znamienny tym, że reakcję związku o wzorze 2 z aminą prowadzi się w zakresie temperatur od 80 do 140 °C.
15. Kompozycja farmaceutyczna o działaniu przeciwnowotworowym, zawierająca efektywnie, przeciwnowotworowo działającą ilość związku wg zastrz. 1, w kombinacji z co najmniej jednym obojętnym, farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem lub rozcieńczalnikiem.
16. Kompozycja farmaceutyczna o działaniu przeciwnowotworowym, zawierająca efektywnie, przeciwnowotworowo działającą ilość związku wg któregośkolwiek z zastrz. 2-7, w kombinacji z co najmniej jednym obojętnym, farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem lub rozcieńczalnikiem.
17. Zastosowanie nowych pochodnych wg zastrz. 1, do wytwarzania leku o działaniu przeciwnowotworowym.
18. Zastosowanie nowych pochodnych wg któregośkolwiek z zastrz. 2-7, do wytwarzania leku o działaniu przeciwnowotworowym.
19. Sposób hamowania aktywności kinezy kazeinowej 2 u pacjentów wymagających takiego leczenia przez podawanie skutecznej ilości związku o wzorze 1 według zastrz. 1.
20. Sposób hamowania aktywności kinezy kazeinowej 2 u pacjentów wymagających takiego leczenia przez podawanie skutecznej ilości związku wg któregośkolwiek z zastrz. 2-7.

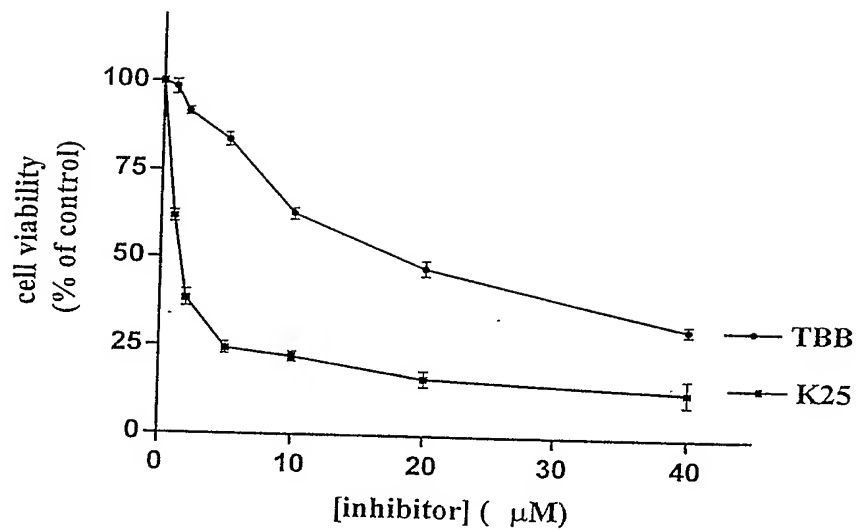


Fig. 1.

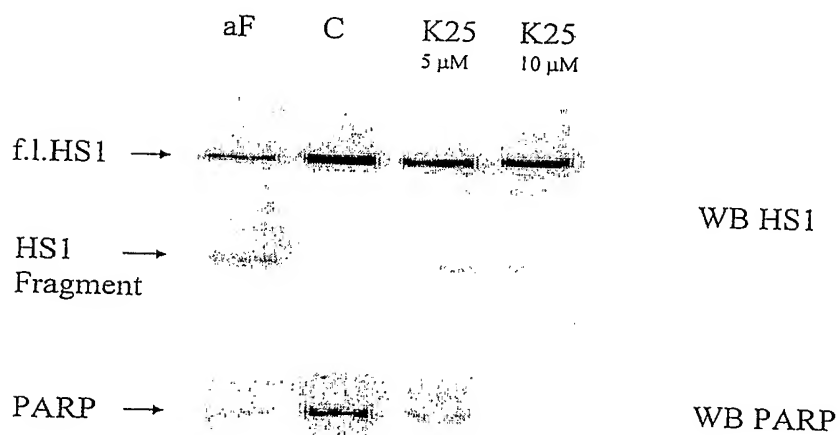


Fig.2.